

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12N 15/29, 5/14, C07K 14/415, 16/16, C12P 21/02, C12Q 1/68, A01H 5/00		A1	(11) 国際公開番号 WO00/37644 (43) 国際公開日 2000年6月29日(29.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/07224			(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)
(22) 国際出願日 1999年12月22日(22.12.99)			(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (CH, DE, FR, GB, IT, NL)
(30) 優先権データ 特願平10/365604 1998年12月22日(22.12.98)	JP		添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 農林水産省農業生物資源研究所長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL RESOURCES)[JP/JP] 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 福田篤徳(FUKUDA, Atsunori)[JP/JP] 田中喜之(TANAKA, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水産省農業生物資源研究所内 Ibaraki, (JP)			

(54) Title: SODIUM/PROTON COUNTERTRANSPORTER GENE

(54) 発明の名称 ナトリウム／プロトン対向輸送体遺伝子

(57) Abstract

A rice Na^+/H^+ countertransporter gene has been successfully cloned. Use of the thus isolated gene or a gene functionally equivalent thereto makes it possible to construct salt-tolerant plants.

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

イネのNa⁺/H⁺対向輸送体遺伝子をクローニングすることに成功した。単離した遺伝子やこれと機能的に同等な遺伝子を利用して、耐塩性植物の作出を行うことが可能である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スウェーデン
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モaco	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニダッド・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ベトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーベル・ラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

ナトリウム／プロトン対向輸送体遺伝子

技術分野

本発明は、植物由来の新規な Na^+/H^+ 対向輸送体、該輸送体によりコードされるDNA、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

植物の耐塩性は農業および環境保全上重要な問題である。現在、地球上の約3分の1は乾燥地に属しているといわれ、現在も耕地や緑地の砂漠化が進んでいることから、その割合は将来増加することが予想される。2050年には世界人口が現在の1.5倍以上になるといわれ、食糧問題はますます深刻化することを考えると、耕作不適地、特に乾燥地でも育つ作物品種や栽培技術の開発は緊急を要する課題である。そこで、乾燥地の農業において問題となっているのは、土壤における塩分集積の問題である。乾燥気候下では、蒸発散量が降水量を上回るため、排水が不完全な状態で灌漑を続けた場合、塩分を含んだ地下水位の上昇が促進されて塩分が地表に析出するため、土壤における多量な塩分集積に結びつく。その結果耕作が不能になる例は、チグリス＝ユーフラテス文明の滅亡を代表に太古の昔から知られており、現在でも未だ問題になることが多い。以上のことから、作物の耐塩性を高めることは、乾燥地や塩分集積地の農業を進める上で重要な課題となっている（但野利秋（1983）化学と生物 21, 439-445 作物の耐塩性とその機構；内山泰孝（1988）化学と生物 26, 650-659 塩性環境の農業利用）。

植物に対する塩ストレスを考える場合、2種類のストレス、つまり浸透圧ストレスとイオンストレスが問題になる。浸透圧ストレスとは、植物を取り囲む環境が高い濃度の塩分のため高浸透圧となり、植物の水分吸収の妨げになると

同時に植物体から水を奪う結果となることから、乾燥ストレスと同じ作用をするストレスである。植物にはこの浸透圧ストレスを回避する機構が存在することが知られており、その中心的働きをするのがイオン (K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、有機酸など) や適合溶質と呼ばれる物質である。適合溶質とは、細胞内に高濃度蓄積されても種々の代謝系を乱さず酵素活性を阻害しない糖、アミノ酸の一種プロリン、四級アンモニウム化合物のグリシンベタインなどを指し、植物はこれらを細胞内に蓄積して外界との浸透圧バランスをとっている（石谷学、荒川圭太、高部鉄子（1990）植物の化学調節 25, 149-162 植物耐塩性の分子機構）。

イオンストレスについては、植物の回避機構についてほとんど研究が進んでいない。過剰な Na^+ が植物の細胞内に吸収されると、細胞内の酵素反応が阻害され代謝障害が起こる（間篠徹（1997）植物の化学調節 32, 198-206 植物の耐塩性メカニズム）。そのため、細胞内に蓄積した Na^+ を細胞外に排出したり、液胞などの細胞内器官に隔離する必要がある。その中心的な働きをすると考えられているのが Na^+/H^+ 対向輸送体（ナトリウム／プロトン対向輸送体）である。植物の Na^+/H^+ 対向輸送体は、細胞質膜や液胞膜に存在すると考えられ、 H^+ を輸送する H^+ ポンプ（ H^+ -ATPaseや H^+ -PPase）によって形成される生体膜を介したpH勾配をエネルギー源として利用して、細胞質に存在する Na^+ を細胞外や液胞内に輸送する。また、高塩処理を受けた植物は、細胞質内の K^+/Na^+ 比率を高く保たねばならず、 Na^+/H^+ 対向輸送体によって液胞に Na^+ を蓄積することにより、外界との浸透圧バランスをとるとも考えられている。

細胞質膜に局在する Na^+/H^+ 対向輸送体については、動物、酵母、細菌などでよく調べられている。動物細胞の細胞質膜では、細胞内の H^+ バランスをとるために、 Na^+/K^+ -ATPaseによって形成された膜内外の Na^+ 濃度勾配を利用して Na^+/H^+ 対向輸送体が H^+ を輸送する。このため、この対向輸送体は、細胞内のpH調整、細胞容量のコントロール、細胞質膜を介した Na^+ 輸送などに強く関与していると考えられている（Orlowski, J. and Grinstein, S. (1997) J. Biol. Chem. 2

72, 22373-22376; Aronson, P.S. (1985) Ann. Rev. Physiol. 47, 545-560)。動物では、 Na^+/H^+ 対向輸送体は様々な細胞に存在し、6種類のアイソフォーム (NHE1-6) が報告されている (Orlowski, J. and Grinstein, S. (1997) J. Biol. Chem. 272, 22373-22376)。酵母では、まず分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe) で Na^+ 輸送と耐塩性に関連した遺伝子としてクローニングされ (sod2) (Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. and Young, P.G. (1992) EMBO J. 11: 1631-1640)、これと高い相同意を持った遺伝子が出芽酵母 (Saccharomyces cerevisiae) や Zygosaccharomyces rouxii で見つかっている (それぞれNHA1、ZSOD2と名付けられている) (Prior, C. et al. (1996) FEBS Letter 387, 89-93; Watanabe, Y. et al. (1995) Yeast 11, 829-838)。大腸菌では、異なった2種類の Na^+/H^+ 対向輸送体遺伝子 (nhaA, nhaB) が単離されており (Karpel, R. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263, 10408-10410; Pinner, E. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 26274-26279)、それぞれ Na^+ 輸送と耐塩性に強く関与している。植物では、藻類などで活性が調べられている (Katz, A. et al. (1989) Biochim. Biophys. Acta 983: 9-14)。

一方、液胞膜に局在しているものについては植物のみから活性についての報告があるにすぎない。液胞膜の Na^+/H^+ 対向輸送体は、塩濃度の高い環境に生育する塩生植物 (Matoh, T. et al. (1989) Plant Physiol. 89: 180-183; Hassidim, M. et al. (1990) 94: 1795-1801; Barkla, B.J. et al. (1995) Plant Physiol. 109: 549-556) やオオムギやテンサイなどの耐塩性の高い中生植物 (Hassidim, M. et al. (1990) 94: 1795-1801; Blumwald, E. et al. (1987) Plant Physiol. 85: 30-33; Garbarino, J. and DuPont, F.M. (1988) Plant Physiol. 86: 231-236; Garbarino, J. and DuPont, F.M. (1989) Plant Physiol. 89: 1-4; Staal, M. et al. (1991) Physiol. Plant. 82: 179-184) において耐塩性と結びつけて今まで調べられている。以上のこととは、 Na^+/H^+ 対向輸送体と植物の耐塩性が密接な関係にあることを示している。液胞膜の Na^+/H^+ 対向輸送体の性質についてはいくつか報告がある。その輸送体活性の Na^+ に対する K_m

値は約10 mMであり、哺乳類の細胞質膜のものと似ている (Blumwald, E. et al. (1987) *Plant Physiol.* 85: 30-33; Garbarino, J. and DuPont, F.M. (1988) *Plant Physiol.* 86: 231-236; Orlowski, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 16369-16377)。また、 Na^+ 輸送体の特異的阻害剤であるアミロライドやアミロライド誘導体は、それらの対向輸送体両方を競合的に阻害することが知られている (Blumwald, E. et al. (1987) *Plant Physiol.* 85: 30-33; Orlowski, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 16369-16377; Tse, C.M. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 11917-11924; Fukuda, A. et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39: 196-201)。これらのこととは、植物の液胞膜の Na^+/H^+ 対向輸送体の性質が哺乳類の細胞質膜のものと類似していることを示唆している。以上のように、植物の Na^+/H^+ 対向輸送体の活性については様々な報告があるが、その本体、つまり遺伝子やタンパク質については、今まで様々な試みがなされてきたが、その解析は遅れていた (Katz, A. et al. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 983: 9-14; Barkla, B. and Blumwald, E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11177-11181; Katz, A., Kleyman, T. R., and Pick, U. (1994) *Biochemistry* 33: 2389-2393)。

最近になり、アラビドブシスにおいて既知の Na^+/H^+ 対向輸送体のアミノ酸配列と相同性を有するタンパク質をコードすると予想される遺伝子がクローニングされたが、その機能については解明されていない (M.P. Apse et al., (1998) *Final Programme and Book of Abstracts "11th International Workshop on Plant Membrane Biology"*, Springer; C.P. Darley et al., (1998) *Final Programme and Book of Abstracts "11th International Workshop on Plant Membrane Biology"*, Springer)。

植物において単離された Na^+/H^+ 対向輸送体遺伝子は、上記の双子葉植物であるアラビドブシスの例にとどまり、産業上有用な農作物であるイネやトウモロコシなどを含む单子葉植物については、いまだ遺伝子の単離は報告されていない。

発明の開示

重要な農作物の中でも、特にイネは耐塩性の低い作物であり、耐塩性の高い作物であるオオムギが250mMのNaClで生長が半分に抑えられるのに対し、イネは150mMで同じ阻害を受ける。Garbarino等は、オオムギでは根の液胞にNa⁺を蓄積することで茎葉へのNa⁺の流れを抑えて耐塩性を高めているのではないかと報告している (Garbarino, J. and DuPont, F.M. (1988) *Plant Physiol.* 86: 231-236)。これを裏付ける結果として、オオムギ根の液胞膜のNa⁺/H⁺対向輸送活性は塩処理によって上昇し、イネよりはるかに高い活性をもつことが分かっている (Garbarino, J. and DuPont, F.M. (1988) *Plant Physiol.* 86: 231-236; Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S., and Tanaka, Y. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39: 196-201)。

一方、イネにおいては塩処理により活性は上昇しない (Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S., and Tanaka, Y. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39: 196-201)。さらに、イネにおける根から茎葉へのNa⁺輸送は、同じイネ科の植物である耐塩性の高いヨシより高いことが分かっているため (Matsushita, N. and Matoh, T. (1991) *Physiol. Plant.* 83: 170-176)、根の液胞膜のNa⁺/H⁺対向輸送活性の強さがイネの耐塩性に強く関係している可能性がある。これらの報告は、イネ根のNa⁺/H⁺対向輸送活性を高めることができること、イネの耐塩性を高め得る可能性を示唆している。このためイネのNa⁺/H⁺対向輸送体活性を高め得る遺伝子の単離が強く望まれていた。

本発明は、このような状況に鑑みてなされたなされたものであり、その目的は、単子葉植物、好ましくはイネ由来のNa⁺/H⁺対向輸送体および該輸送体をコードするDNA、並びにそれらの製造および用途を提供することにある。本発明は、本発明のDNAの好ましい用途として、耐塩性植物体の作出のための該遺伝子の利用を提供する。

本発明者らは、出芽酵母のNa⁺/H⁺対向輸送体 (NHX1) 遺伝子とホモロジーが

ある塩基配列をGeneBankの高等植物のデータベースから解析し、イネの花序由来のcDNAクローニングを同定した。この配列をプローブとして用いて、イネcDNAライブラリーをスクリーニングし、イネの Na^+/H^+ 対向輸送体をコードすると予想される、「OsNHX1」と命名された新規遺伝子の全長をクローニングすることに成功した。

単離されたOsNHX1 cDNAは約2.3kbであり、535アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると予想される（図1）。アミノ酸の疎水性解析の結果、該タンパク質には12の膜貫通領域が検出された（図2）。

OsNHX1から予想されるアミノ酸配列は、NHX1や哺乳類の Na^+/H^+ 対向輸送体（NHE）のアミノ酸配列と有意な相同性が検出された（表1）。特に、イオン輸送に関係していると思われる膜貫通領域で高い相同性が見られた（図3）。

今まで報告されている種々の Na^+/H^+ 対向輸送体について系統樹を作成すると、出芽酵母のNHX1、哺乳類のNHE6、OsNHX1の3つがクラスターをつくることが判明した（図4）。NHX1は後期エンドソームで発現しているという報告があり（Nass, R. and Rao, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 21054-21060）、また、NHE6も細胞内で発現していることが示唆されている（Numata, M., Petrecca, K., Lake, N., and Orlowski (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 6951-6959）ことから、本発明のOsNHX1は、液胞などの細胞内器官で発現し、液胞膜への Na^+ 輸送に重要な働きをしていると考えられる。

本発明者等は、さらに、アグロバクテリウム法を利用して、単離したOsNHX1遺伝子をイネカルスに導入し、これを再分化させてトランスジェニック植物体を得ることにも成功した。

本発明は、単子葉植物由来の新規な Na^+/H^+ 対向輸送体および該輸送体をコードするDNA、並びにそれらの製造および用途、特に耐塩性植物の作出のための用途に関し、より具体的には、

1. 下記（a）または（b）に記載のDNA、

（a）配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDN

A。

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

2. 单子葉植物由来のNa⁺/H⁺対向輸送体をコードする下記(a)または(b)に記載のDNA、

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA。

3. 单子葉植物がイネ科植物である、(2)に記載のDNA、

4. (1)または(2)に記載のDNAを含むベクター、

5. (1)若しくは(2)に記載のDNAまたは(5)に記載のベクターを保持する形質転換細胞、

6. 植物細胞である、(5)に記載の形質転換細胞、

7. (1)または(2)に記載のDNAによりコードされるタンパク質、

8. (5)に記載の形質転換細胞細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(7)に記載のタンパク質の製造方法、

9. (6)に記載の形質転換細胞を含む形質転換植物体、

10. 单子葉植物である、(9)に記載の形質転換植物体、

11. イネ科植物である、(10)に記載の形質転換植物体、

12. イネである、(11)に記載の形質転換植物体、

13. (9)から(12)のいずれかに記載の形質転換植物体の子孫またはクローニングである、形質転換植物体、

14. (9)から(13)のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料、

15. (7)に記載のタンパク質に結合する抗体、

16. 配列番号：1に記載のDNAとハイブリダイズする、少なくとも15ヌクレ

オチドの鎖長を有する核酸分子、を提供するものである。

本発明は、単子葉植物由来の新規な Na^+/H^+ 対向輸送体および該輸送体をコードするDNAを提供する。本発明者等により単離されたイネ由来の Na^+/H^+ 対向輸送体「0sNHX1」をコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

「0sNHX1」遺伝子は、既知の複数の Na^+/H^+ 対向輸送体のアミノ酸配列と有意な相同意を有しており、特にイオン輸送に関連する部分において高い相同意が認められた。この事実は、「0sNHX1」タンパク質が、イネにおける Na^+ 輸送に重要な役割を果たしていることを示唆する。植物の Na^+/H^+ 対向輸送体は、高塩ストレス下においては、植物体内の浸透圧のバランスの確保に関与していることが考えられている。従って、「0sNHX」遺伝子は、特に、植物の耐塩性品種の作出などへの応用が可能であると考えられる。

本発明には、「0sNHX1」タンパク質のみならず、これと同等の機能を有するタンパク質も含まれる。本発明において「「0sNHX1」タンパク質と同等の機能を有する」とは、対象となるタンパク質が Na^+/H^+ 対向輸送体として機能することを指す。 Na^+/H^+ 対向輸送体活性は、例えば、単離した生体膜小胞内外に H^+ -ATPaseによって形成させた H^+ 濃度勾配をアクリジンオレンジの蛍光消光によってモニターし、 Na^+ 添加による生体膜小胞内からの H^+ の排出を蛍光の回復として測定することができる (Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S., and Tanaka, Y. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39: 196-201.)。

「0sNHX1」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質の1つの態様は、「0sNHX1」タンパク質のアミノ酸配列（配列番号：2）において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／若しくは付加したアミノ酸配列を有し、「0sNHX1」タンパク質と同等な機能を有する変異タンパク質である。このようなタンパク質は、例えば、以下の方法により調製することが可能である。当業者によく知られた方法としては、例えば、「0sNHX1」タンパク質のアミノ酸に変異を導入する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、例えば、タンパ

ク質の活性を高めるなどの目的で、部位特異的変異導入法 (site-directed mutagenesis法) (Kramer, W. & Fritz, H.-J. Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis via gapped duplex DNA. Methods in Enzymology, 154 : 350-367, 1987) などを利用して、「OsNHX1」タンパク質 (配列番号 : 2) 中のアミノ酸配列を改変し、「OsNHX1」タンパク質と同等の機能を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもある。本発明のタンパク質には、このように人工的であると天然由来であるとを問わず、天然型の「OsNHX1」タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 : 2) において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加したアミノ酸配列を有し、該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が含まれる。タンパク質におけるアミノ酸の改変部位および改変個数は、改変後のタンパク質が天然型の「OsNHX1」タンパク質と同等の機能を有する限り、特に制限はない。アミノ酸の改変は、一般的には、100アミノ酸以内であり、好ましくは50アミノ酸以内であり、さらに好ましくは20アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内である。

また、「OsNHX1」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質の他の態様は、「OsNHX1」タンパク質をコードするDNA (配列番号 : 1) とハイブリダイズする単子葉植物由来のDNAがコードするタンパク質であって、「OsNHX1」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質である。このようなタンパク質を調製するために、当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, E.M.: Journal of Molecular Biology, Vol. 98, 503, 1975.) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, R. K. et al. Science, vol. 230, 1350-1354, 1985. Saiki, R. K. et al. Science, vol. 239, 487-491, 1988) が挙げられる。即ち、当業者にとって、「OsNHX1」遺伝子の塩基配列 (配列番号 : 1) もしくはその一部をプローブとして、また「OsNHX1」遺伝子の塩基配列 (配列番号 : 1) に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネ若しくは他の単子葉植物から「OsNHX1」遺伝子と高

い相同性を有するDNAを単離し、該DNAから「OsNHX1」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることは通常行いうことである。このようにハイブリダイズ技術やPCR技術により単離しうる「OsNHX1」タンパク質と同等の機能を有する単子葉植物由来のタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

ハイブリダイズ技術やPCR技術により遺伝子を単離するための植物としては、単子葉植物、好ましくはイネ科植物が挙げられる。イネ科植物としては、例えば、イネ以外に、オオムギ (Hordeum vulgare)、コムギ (Triticum aestivum)、トウモロコシ (Zea mays) などが挙げられるが、これらに制限されない。

上記の技術を利用して、「OsNHX1」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離する方法としては、例えば、以下のような方法が挙げられるが、これらに限られない。例えば、³²P等でラベルしたプローブ（例えば、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部）を用いて、単子葉植物から調製したcDNAあるいはゲノミックライブラリーを用いたハイブリダイゼーションを行う。³²Pでラベルしたプローブを用いたハイブリダイゼーションの条件は、ハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 5x SSPE, 2x Denhard's solution, 0.1% (w/v) SDS, and 100 μ g/ml of herring sperm DNA (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), 2nd Ed.)) を用いて緩やかな条件では25°C (formamideを含まない)、通常の条件では42°Cで行う。プレハイブリダイゼーションは少なくとも1時間以上行い、ハイブリダイゼーションの時間を24時間で行う。ハイブリダイゼーションを行ったフィルターの洗浄は、緩やかな条件 (低ストリンジエントな条件) では25°C (洗浄用溶液： 2x SSC, 0.1% SDS)、通常の条件では42 °C (洗浄用溶液： 2x SSC, 0.1% SDS)、厳しい条件 (高ストリンジエントな条件) では56°C (洗浄用溶液： 0.1x SSC, 0.1% SDS) で行う。

これにより単離されたDNAがコードするタンパク質が「OsNHX1」タンパク質と同等の機能を有す場合、通常、「OsNHX1」タンパク質とアミノ酸配列において

高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも60%以上の相同性、好ましくは80%以上の相同性、さらに好ましくは85%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上の相同性を指す。アミノ酸配列の相同性は、例えば、GENETYXソフトウェア（ソフトウェア開発株式会社）のホモロジー解析プログラム（Lipman, D.J. and Pearson, W.R. (1985) *Science* 227, 1435-1441）により算出することができる。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組み換えタンパク質は、後述するが、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、該形質転換細胞から精製することにより調製することが可能である。また、天然のタンパク質は、例えば、調製した組み換えタンパク質若しくはその部分ペプチドを適当な免疫動物に免疫することにより調製した抗体を結合したアフィニティーカラムに、本発明のタンパク質を発現している細胞（例えば、イネ細胞）などから調製した抽出液を接触させて、該カラムに結合するタンパク質を精製することにより調製することができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードし得るものであれば特に制限はなく、ゲノムDNA、cDNA、および化学合成DNAなどが含まれる。本発明のDNAに含まれる「OsNHX1」cDNAの塩基配列を配列番号：1に示す。

ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。例えば、ゲノムDNAは、本発明の遺伝子の塩基配列情報から適当なプライマー対を設計してPCRを行い、得られる増幅DNA断片をプローブとして用いてゲノミックライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。また、例えば、同様にしてcDNAライブラリーからcDNAを単離することができる。

本発明のDNAは、例えば、組み換えタンパク質の調製や耐塩性の形質転換植物

体の作出などに利用することが可能である。組み換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。

組み換えタンパク質は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAが挿入されたベクターを、エレクトロポレーション法やリン酸カルシウム法などの公知の遺伝子導入法を利用して、大腸菌等のバクテリア、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞などに導入し、これら細胞内で組み換えタンパク質を発現させて調製することができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、当業者に公知の方法により精製することが可能である。例えば、大腸菌ではpGEX (Pharmacia) などの発現ベクターを用いてグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させ、グルタチオンカラムを用いて精製することができる（大野茂男、西村善文（1997）細胞工学別冊タンパク実験プロトコール、秀潤社）。

また、本発明のDNAを利用して形質転換植物体を作製する場合には、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。植物細胞への植物発現ベクターの導入には、植物細胞の種類に応じて、例えば、アグロバクテリウムを介する方法や直接細胞に導入する方法を用いることが可能である。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、Nagelらの方法（Microbiol. Lett. 67, 325 (1990)）やイネの場合Rainieriらの方法（BIO/TECHNOLOGY 8, 33-38 (1990)）が用いられる。これらの方法は、植物発現ベクター（pUC系のベクターなど。例えば、pCAMBIAベクター（Medical Research Council）など）を用いてアグロバクテリウムを形質転換し、形質転換されたアグロバクテリウムをリーフディスク法やカルス法等によって植物細胞に導入する方法である。植物発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム法、及びポリエチレングリコール

法などが挙げられる。

ベクターを挿入する植物細胞としては、特に制限はないが、単子葉植物、好ましくはイネ科植物の細胞である。イネ科植物としては、イネ以外に、例えばトウモロコシなどが挙げられる。なお、本発明の「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

ベクターを挿入したトランスジェニック植物細胞からトランスジェニック植物体の再生には、植物の種類に応じて、例えば、カルスの再分化法 (Kyozuka, J. and Shimamoto, K. (1991) *Plant Tissue Culture Manual*. Kluwer Academic Publishers, pp B1, 1-16、Toki, S. (1997) *Plant Molecular Biology* 15, 16-21) やプロトプラストを用いた再分化法 (Shimamoto, K. et al. (1989) *Nature* 338, 274-276 ; Kyozuka, J. et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 206, 408-413) などが用いられ得る。

これにより作出されたトランスジェニック植物体は、野生型植物体と比較して高い Na^+/H^+ 対向輸送体活性を示し、これにより耐塩性が付与されると考えられる。また、一旦、ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体が得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。

このような野生型植物体と比較した高い Na^+/H^+ 対向輸送体活性は、 Na^+/H^+ 対向輸送体の高発現（量的変化）によって達成しても、より高い活性を有する Na^+/H^+ 対向輸送体の発現（質的変化）によって達成しても、これら双方であってもよい。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質に結合する抗体を提供する。本発

明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。抗体の作製は、当業者に公知の方法、例えば、Harlowらの方法 (Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) を用いることができる。ポリクローナル抗体は、ウサギに大腸菌などで合成させた融合タンパク質や合成ペプチドを抗原として注射し、得られた抗血清をアフィニティーカラムにかけて抗体を精製することで得られる。モノクローナル抗体は、マウスやラットに抗原を注射し、ハイブリドーマを調製してクローニングを行い、得られた抗体をアフィニティーカラムにかけることで得られる。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズする、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する核酸分子を提供する。このような核酸分子は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAを検出または単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。このような核酸分子は、好ましくは本発明のタンパク質をコードするDNAと特異的にハイブリダイズする。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジントなハイブリダイゼーション条件下で、本発明のタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズし、他のタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズしないことを指す。

また、このような核酸分子は本発明のタンパク質の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等として利用することも可能である。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質の発現を抑制し得る限り、DNAまたはmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対し完全に相補的である必要はなく、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。本発明のタンパク質の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムは、本発明のタンパク質の機能を解析するための非常に

有用なツールとなる。

図面の簡単な説明

図1は、イネの Na^+/H^+ 対向輸送体 (OsNHX1) cDNAの塩基配列、および予想されるアミノ酸配列を示す図である。アミノ酸配列は一文字表記で表した。

図2は、0sNHX1タンパク質のアミノ酸の疎水性プロットを示す図である。横軸はアミノ酸残基、縦軸は疎水度を示す。予想される膜貫通領域をボックス内の数字で示した。

図3は、0sNHX1と他の Na^+/H^+ 対向輸送体とのアミノ酸配列の比較を示す図である。膜貫通領域（M3～M6）を配列の上部に示した。全てのアミノ酸が同一の場合は「*」を、類似したアミノ酸の場合は、類似度が高い順に「:」または「.」をアミノ酸の下部に示した。Aのボックスは Na^+ 輸送体の特異的阻害剤アミロライドの結合部位を表し、Bのボックスは哺乳類の Na^+/H^+ 対向輸送体において相同性が高い部位を表す。

図4は、ClustalX (Thompson, J.D. et al., (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680) (最近隣(NJ)法) を用いた Na^+/H^+ 対向輸送体の系統発生学的解析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] イネ Na^+/H^+ 対向輸送体遺伝子のクローニング

出芽酵母で得られたNa⁺/H⁺対向輸送体(NHX1)とホモロジーがあるシーケンスをGeneBankの高等植物のデータベースから解析し、イネの花序由来のcDNAクローンを同定した。そのクローンから予想されるアミノ酸配列は、Nhx1と37%のホモロジーがあった。得られたcDNAクローンは全長の塩基配列が挿入されていないことが予想されたので、そのcDNAクローンをプローブとして、イネ(0r)

yza sativa L. cv Nipponbare) 幼植物の根から調製したmRNAを鋳型にして合成したcDNAライブラリーから、全長が挿入されたcDNAクローンの選抜を試みた。

イネは、一晩浸水させ、栄養塩類溶液 (0.5 mM NH₄H₂PO₄, 1 mM KNO₃, 0.5 mM MgSO₄, 12.5 μM Fe-EDTA, 1 mM CaCl₂, micronutrients) を用いて水耕栽培した。昼 (光度40 μmol m⁻² s⁻¹) 14時間30°C、夜10時間25°C、湿度75%の栽培条件で7日間栽培した。

cDNAライブラリーは、イネ幼植物の根からポリ(A⁺) RNAを調製し、5から25%のスクロース密度勾配遠心によってサイズ分画を行い、比較的大きいポリ(A⁺) RNAを含む分画から構築した (Tanaka, Y. et al. (1989) Plant Physiol. 90, 1403-1407)。サイズ分画を行ったポリ(A⁺) RNAは、GublerとHoffmanの方法 (Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) Gene 25, 263-269) によってオリゴdTをプライマーとして2本鎖cDNAを合成し、Asahipack GS710カラム (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo; 2.5X50 cm)を用いて高速液体クロマトグラフィー (Tosoh, Tokyo, model CCPD) によってサイズ分画を行った。2kb以上のcDNAをλgt11のEco RI サイトに挿入した。

構築したcDNAライブラリーをもつ入ファージを用い、NHX1とホモジーのあるcDNAクローンをプローブとしてブラークハイブリダイゼーションを行った。シグナルのあったブラークの中から、ベクターに挿入されたcDNAが最も長いものを選び、切り出したcDNAをpBluescript (KS+)ベクター (Stratagene社)に挿入してクローニングを行った。得られたcDNAクローンが全長であることの確認は、そのクローンをプローブとして、イネ植物体から抽出したRNAを用いたノーザンハイブリダイゼーションによって得られたシグナルのサイズによって確認した。単離された遺伝子 (OsNHX1と称する) 全長が挿入されたcDNAクローンの全塩基配列を決定した (図1)。

[実施例2] OsNHX1遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の解析

全長は2330塩基対、5' 非翻訳領域は296塩基対、翻訳領域は1608塩基対、3' 非翻訳領域は426塩基対であった。OsNHX1がコードしているタンパク質は535ア

ミノ酸と予想され、分子量の計算値は59,070であった。予想されるアミノ酸配列は、59%の疎水性、22%の中性、19%の親水性アミノ酸から成り、疎水性の高いタンパク質であることが考えられた。KyteとDoolittleの方法 (Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132)による疎水性解析の結果を図2に示す。TMpred program (Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993) *Bio 1. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166)による解析によって、12回膜貫通領域を検出した。

OsNHX1から予想されるアミノ酸配列は、NHX1や哺乳類のNa⁺/H⁺対向輸送体 (NHE) のアミノ酸配列と有意な相同性が検出された (表1; 表中、NHX1は酵母 [*S. cerevisiae*]由来、NHE6はヒト由来、NHE1~4はラット由来である。また、表中の数値の算出には、GENETYX (ver.10)ソフトウェア (ソフトウェア開発株式会社) のホモロジー解析プログラムを用いた (Lipman, D.J. and Pearson, W. R. (1985) *Science* 227, 1435-1441)。特に、イオン輸送に関係していると思われる膜貫通領域で高い相同性が見られた (図3)。OsNHX1のアミノ酸部分配列である⁸³LFFIYLLPPI⁹²の領域は、NHX1やNHEでも非常によく保存されており、真核生物のNa⁺/H⁺対向輸送体を阻害するアミロライドの結合部位と考えられている (Counillon, L. et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4508-4512) (図3A)。また、真核生物のNa⁺/H⁺対向輸送体では、6番目と7番目の膜貫通領域がよく保存されており、Na⁺とH⁺の輸送に重要な働きをしていると考えられている (Orlowski, J. and Grinstein, S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22373-22376) が、OsNHX1の5番目と6番目の膜貫通領域はこれらの領域と相同性が高かった (図3B)。以上のこととは、OsNHX1がコードするタンパク質がNa⁺/H⁺対向輸送活性を持つことを示唆している。

表 1

OsNHX1と他のNa⁺/H⁺対向輸送体とのアミノ酸配列の相同性 (%)

	OsNHX1	NHX1	NHE6	NHE1	NHE2	MHE3	NHE4
OsNHX1	100	29.5	33.0	30.1	29.4	26.7	27.7
NHX1		100	36.1	28.6	29.1	29.3	32.0
NHE6			100	31.9	29.1	31.8	28.6
NHE1				100	48.9	37.1	45.5
NHE2					100	44.7	66.0
NHE3						100	44.6
NHE4							100

今まで報告されている種々のNa⁺/H⁺対向輸送体、すなわち、哺乳類のNHE、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) のNHX1およびNHA1、分裂酵母 (*S. pombe*) の細胞質膜で発現していると思われるSod2、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) のZSod2、大腸菌 (*E. coli*) のNhaAおよびNhaB、及びOsNHX1（図中「OsNHX1」と表記）についてNJ法により系統樹を作成すると、NHX1、NHE6、OsNHX1の3つがクラスターをつくることが判明した（図4）。NHX1が後期エンドソームで発現しているという報告があり（Nass, R. and Rao, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 21054-21060）、また、NHE6も細胞内で発現していることが示唆されている（Numata, M., Petrecca, K., Lake, N., and Orlowski, J., *J. Biol. Chem.* 273: 6951-6959）。これらのことから、OsNHX1が液胞などの細胞内器官で発現し、これら器官においてNa⁺輸送に重要な働きをしていると考えられる。

[実施例3] イネNa⁺/H⁺対向輸送体遺伝子を発現する形質転換イネの作出
pBluescript KS+ (STRATAGENE社) のBamHIサイトに挿入したOsNHX1をKpnIと

NotIにより切り出し、Ti-plasmid由来でカナマイシンとハイグロマイシン耐性遺伝子を導入したpMSH1(高発現用)およびpMSH2(発現抑制用)ベクター(pMSH1については、Kawasaki, T. et al., (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 96, 10922-10926. pMSH2はpMSH1のマルチクローニングサイトが逆向きになったもの)のカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータ一下流に挿入した。構築したベクターを用いて、アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)によりイネカルスを形質転換した。カルスは種子から誘導し、アグロバクテリウム感染後の選抜をハイグロマイシンで行った。選抜したカルスを再分化させ、形質転換植物体を得た。なお、形質転換および再分化は土岐の方法(Toki, S. (1997) *Plant Molecular Biology* 15, 16-21)に基本的に従って行なった。

産業上の利用の可能性

本発明において、単離されたNa⁺/H⁺対向輸送体遺伝子は、植物体内で発現させることにより、該植物体に塩耐性を付与することができると考えられる。このため、例えば、イネなど有用農作物に導入することにより耐塩性を向上させ、乾燥地等においても塩害を受けず、農作物の収穫量を増大させる上で大いに貢献しうる。

請求の範囲

1. 下記 (a) または (b) に記載のDNA。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

2. 单子葉植物由来のNa⁺/H⁺対向輸送体をコードする下記 (a) または (b) に記載のDNA。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリングエントな条件下でハイブリダイズするDNA。

3. 单子葉植物がイネ科植物である、請求項2に記載のDNA。

4. 請求項1または2に記載のDNAを含むベクター。

5. 請求項1若しくは2に記載のDNAまたは請求項5に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

6. 植物細胞である、請求項5に記載の形質転換細胞。

7. 請求項1または2に記載のDNAによりコードされるタンパク質。

8. 請求項5に記載の形質転換細胞細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項7に記載のタンパク質の製造方法。

9. 請求項6に記載の形質転換細胞を含む形質転換植物体。

10. 单子葉植物である、請求項9に記載の形質転換植物体。

11. イネ科植物である、請求項10に記載の形質転換植物体。

12. イネである、請求項11に記載の形質転換植物体。

13. 請求項9から12のいずれかに記載の形質転換植物体の子孫またはク

ローンである、形質転換植物体。

14. 請求項9から13のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。
15. 請求項7に記載のタンパク質に結合する抗体。
16. 配列番号：1に記載のDNAとハイブリダイズする、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する核酸分子。

図 1

1 GAGAAGAGAGTTTGTAGCGAGCTCGCCGAATCGAAGCCACCGAGAGGCTCGATACCAATTCCGATTCTAACCTGAATCCCCCCCCACGT
 101 TCCCTGTTCAATCTGTCGCTCGGAATCGAACATTCTTCTCTAACATTACCGGAATTGCGATTAGGCATTCACCAACGACAAAGAG
 201 GGGAGTGGATCGTGGTAAAGCTCGCATCTCGCGCGAAATCTCGCTCTCTCGGGTGGCTGGAGACTGCCGGTGGTGAAGGATGG
 M G

301 GGATGGAGGTGGCGCGCGCGCTCTGTACACGACCTCCGACTACGGCTGGCTCGTCCATCAACCTGTTCTGGCTGCTCTGGCTG
 M E V A A A R L G A L Y T S T S D Y A S V V S I N L P V A L L C A C

401 CATCGCTCTCGCCACCTCCGAGGGAAATCGCTGGTCAATGACTCCATCACCGCGCTCATCATGGCTCTGACCGCGTGGTGA
 I V L G H L L E R N R M V N E S I T A L I I G L C T G V V I L L M

501 ACCAAAGGGAAAGAGCTCCCACTTATCGCTTCAGTGAGGATCTCTCATCACCTCCCTCCCTGGATCATCTAACATGCAGGTTCAAG
 T K G K S S H L F V F S E D L F F I Y L L P P I I P H A G F Q V K K

601 AAAAGCAATTCTCGGGAAATTCTACGACATCACATTGGAGCGCTGGGACAATGATAATCTTTTACAAATATCTATTGCTGCCATTGCA
 A T T K F F R N F M T I T L F G A V G T M I S F P T I S I A A I P

701 CAGCAGAAATGAAACATTGGACCGCTGGATGTAGGAGATTTCTGCAATTGGAGCCATCTTCTGCGACAGATCTGCTGCACATIGCAGG
 S R M N I G T L D V G D F P L A I G A I F S A T D S V C T L Q V L N

801 CAGGATGAGACACCCCTTTGTACACTCTGGTAACTGGTGAAGGTGTGACCGATGCTACATCAATTGCTTTCAACGCACTACAGAACTTGATC
 Q D E T F F L I S L V F G E G V V N D A T I V L F N A L Q N F D L

901 TTGTCACATAGTCGGCTGCGTCTGAAATTCTGGGGAACTCTTTTATTTGCGACACCTCTGAGTATTGCTGGATTGCTCAG
 V H I D A A V V L K F L G N F F Y L F L S S T F L G V F A G L L S

1001 TCCATACATAATCAAGAACGATACTGGAGGCACTACTGACCGTGGATGCTGACATGGCTACCTTCAATATGCTGGCTGAG
 A Y T I K K L Y I G R H S T D R E V A L M H A Y L S Y M L A E

1101 TTGCTAGATTGAGCGGCACTCTACCGTATCTCTGTTGTAATGTCACATTACACTGGATAACGTACAGAGAGTTCAAGAGTTACACAA
 L L D L S G I L T V F P C G I V M S H Y T W H N V T E S S R V T T K

1201 AGCACCGATTGCAACTCTGCTTCACTGCTGAGACTTTCTCTCTGTATGTTGGATGGATGCAATTGGATAATGAAAATGGAGTTGCCAGTGA
 H A F A T L S P I A E T F L P L I V G H D A L D I E X K W E F A S D

1301 CAGACCTGCAATCCATTGGATAAGCTAACCTGGTAGGATTGGTCTGATTGGAGAGCTGCTTTGATTCGGCTGCGCTTGTGCAACCA
 R P G K S I G I S S I L L G L V L I G R A A F V F P L S P L S N L

1401 ACAAAAGGACCGGAATGAAAAATAACCTGGAGACACGCAAGGTGAAATATGGGGCTGGGTGATGAGAGGAGCTGTCGATTGCTTGCCTAC
 A T K K A P N E K I T W R Q Q V V I W W A G L H R G A V S I A L A Y N

1501 ATAAGTTACAGAGATCTGGCCATACTCAGCTGACGGCAATGCAATAATGTCACCCAGCAGCAACTCTGCTCTTGTGACTATGGTATTGGAT
 K F T R S G H T Q L H G N A I M I T S T I T V V L F S T M V F G M

1601 GATGACAAAGGCAATTGATCAGGCTGCTGCTACCGGCTCAGGCATCTGACCCCTGACCAACTGCTGCTTGTGACTATGGTATTGGAT
 M T K P L I R L L P A S G H P V T S E P S S P K S L H S P L L T

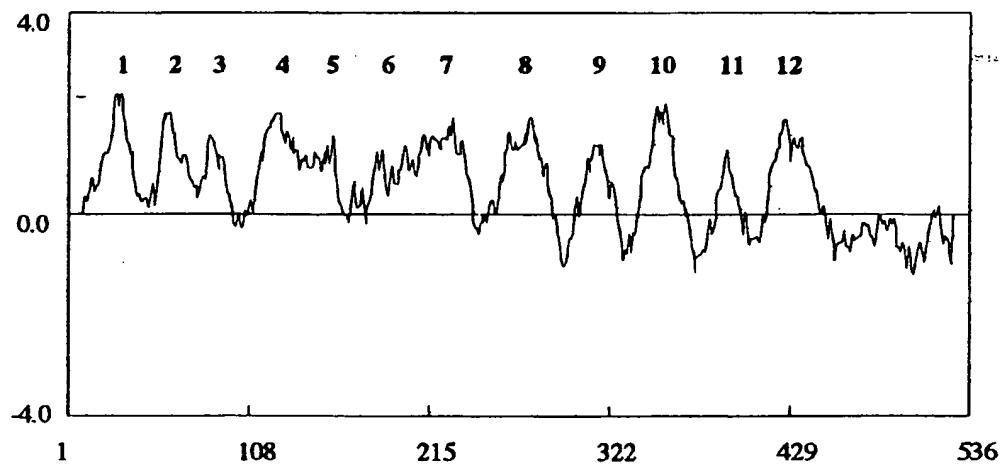
1701 AGCATGCAAGGTTGACCGCTGAGAGTACACCAACATTGTGAGGGCTTCCGGATGCTCTCACCAGCCACACTGTCACACT
 S M Q G S D L E S T T N I V R P S S L R M L L T K P T H T V H Y W

1801 GGGCAAGTTCGACGACGGCTGATGGACCGATGTTGGGGGGGGGGTGTGCGCTTCTCCCTGGATCACCAACCGACCCACACTGTCACACT
 R K F D D A L M R P M P G G R G F V P F S P G S P T E Q S H G G R

1901 ATGAAACAGTGCACAAAGAATGAGAATGGAATGGTGTGAGGAGAAATCATGTAATTGCAACGAAAGAGAGAAGCCAGTTGGTTGTAGAGT
 2001 TGGCTGCTGCTAAATGAGCTCTGATGACTGCCATATATTCTCAGAACCTCAGATGTTGCTACCAAGGCCAAAGGCCATGAGCCAGGAGACCTTC
 2101 TCGGGATATTGGTTGTCAGGATGACCCACTGAGTGCACAGGGTGATGTCCTCCACCAACTGTAATTGAGATTACAGCCCCATT
 2201 GTACCTGCTCATCATTTAGTTGGGGTGTCTTCTACTGTCACCCCTGCACTGAAATGAATTCTCGCCAAAATAGATTGCTGATAATAAA
 2301 TTTGCTGGTGAaaaaaaaaaaaaaaa

2 / 4

図 2



3 / 4

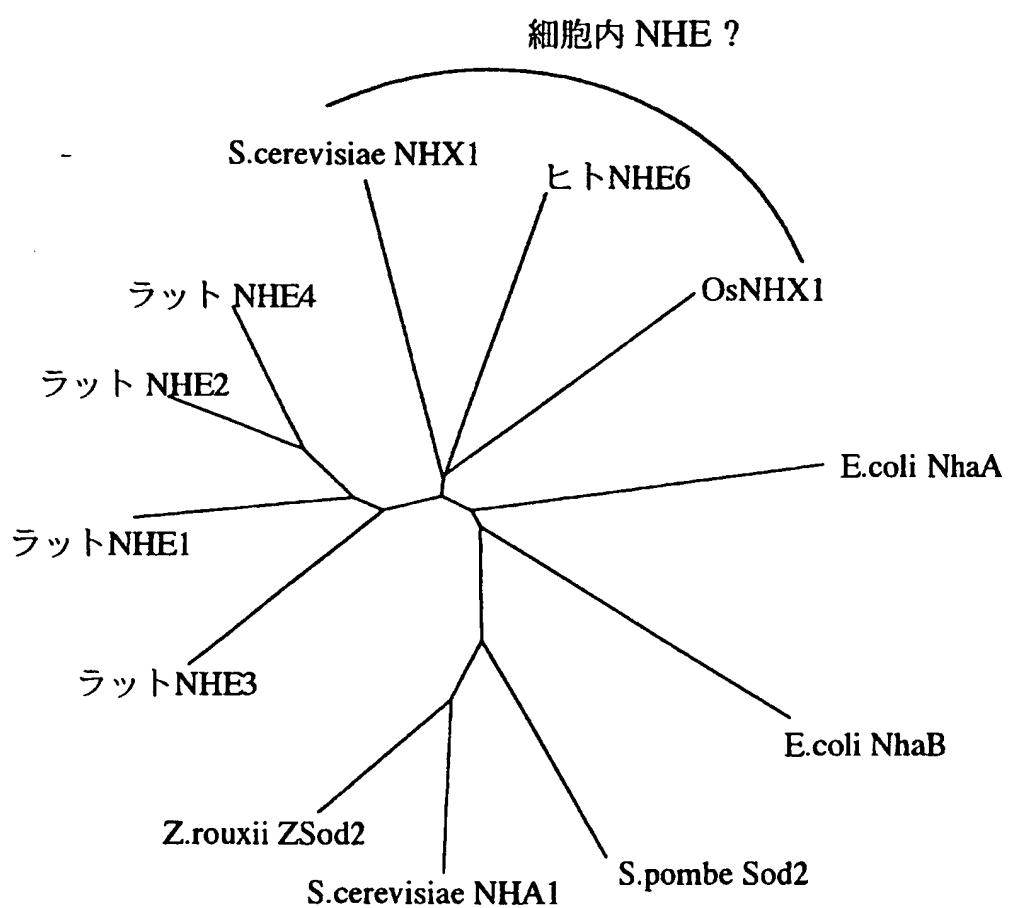
図 3

A	M3	M4
OsNHX1	FSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFMTITLFGAVGT MISFFTISIAIAIFSRM	138
NHX1	FNSSYFFNVLLPPIILNSGYELNQVNFFNNMLSILIFAIPGT FISAVVIGIILYIINTFLG	179
NHE6	FDPEVFFNILLPPIIFYAGYSLKRRHFFRNLSILAYAFLGTAISCFVIGSIMYGCVTLM	205
NHE1	LQSDVFFLFLLPPIILDAGYFLPLRQFTENLGTILIFAVVGT LWNAFFLGGLLYAVCLVG	219
NHE2	MKTDVFFYLILPPIVLDAGYFMPTRPFFENLGTIFWYAVVGT LWNSIGIGLSLFGICQIE	80
NHE3	LTPTLFFFYLILPPIVLDAGYFMPNRLLFGNLGTILLYAVIGTIWNAATTGLSLYGVFLSG	166
NHE4	MDSSIYFLYLLPPIVLESGYFMPTRPFFENIGSILWWAGLGALINAFGIGLSLYFICQIK	184
:	: * * * * : : * : : * : * : * : . * : .	

B	M5	M6
OsNHX1	---NIGTLDVG-DFLAIGAIFSATDSVCTLQVLNQDET-PFLYSLVFGEGVVNDATSI	192
NHX1	----LESIDISFADAMSVGATLSATDPVTILSIFNAYKDPKLYTIIFGESLLNDAISIV	235
NHE6	KVTGQLAGDFYFTDCLLFGAIVSATDPVTVLAIIFHELQVDVELYALLFGESVLNDAVAIV	265
NHE1	---GEQINNIGLLDTLLFGSIISAVDPVAVLAVFEEIHINELLHILVFGESLLNDAVTV	276
NHE2	---AFGLSDITLLCNLLFGSLSISAVDPVAVLAVFENIHVNNEQLYILVFGESLLNDAVTV	137
NHE3	---LMGELKIGLDFLLFGSLLIAAVDPVAVLAVFEEVHVNEVLIIIVFGESLLNDAVTV	223
NHE4	---AFGLGDIINLLCNLLFGSLSISAVDPVAVLAVFEEARVNNEQLYMMIFGEALLNDGISV	241
	.. : : . * : . : * . * * : : . . * . : * * . : * * . : * * . : * *	

4 / 4

図 4



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> National Research Institute of Agrobiological Resources

<120> Sodium/proton exchanger genes

<130> MOA-006PCT

<140> JP 1998-365604

<141> 1998-12-22

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2330

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (297)..(1901)

<400> 1

gagaagagag tttttagcg agctcgcg aatgcgaagc caaccgagag aggtctcgat 60

accaaatccc gatttctcaa cctgaatccc ccccccacgt tcctcgttc aatctgttcg 120

tctgcgaatc gaattcttg ttttttttc tctaattta ccggaaattg tcgaattagg 180

cattcaccaa cgagcaagag gggagtgat tggttggta aagctccgca tcggcg 240

gaaatctcgc tctttctct gcgggtggtg gccggagaag tcggccgg tgaggc atg 299

Met

1

ggg atg gag gtg gcg gcg cgg ctg ggg gct ctg tac acg acc tcc 347

Gly Met Glu Val Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Leu Tyr Thr Thr Ser

5

10

15

gac tac gcg tcg gtg gtg tcc atc aac ctg ttc gtc gcg ctg ctc tgc 395

Asp Tyr Ala Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu Cys

20

25

30

gcc tgc atc gtc ctc ggc cac ctc ctc gag gag aat cgc tgg gtc aat 443

Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val Asn

35

40

45

gag tcc atc acc gcg ctc atc atc ggg ctc tgc acc ggc gtg gtg atc 491

Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val Ile

50 55 60 65

ttg ctg atg acc aaa ggg aag agc tcg cac tta ttc gtc ttc agt gag 539

Leu Leu Met Thr Lys Gly Lys Ser Ser His Leu Phe Val Phe Ser Glu

70 75 80

gat ctc ttc ttc atc tac ctc ctc cct ccg atc atc ttc aat gca ggt 587

Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly

85 90 95

ttt cag gta aag aaa aag caa ttc ttc cgg aat ttc atg acg atc aca 635

Phe Gln Val Lys Lys Gln Phe Phe Arg Asn Phe Met Thr Ile Thr

100 105 110

tta ttt gga gcc gtc ggg aca atg ata tcc ttt ttc aca ata tct att 683

Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Met Ile Ser Phe Phe Thr Ile Ser Ile

115 120 125

gct gcc att gca ata ttc agc aga atg aac att gga acg ctg gat gta 731

Ala Ala Ile Ala Ile Phe Ser Arg Met Asn Ile Gly Thr Leu Asp Val

130 135 140 145

gga gat ttt ctt gca att gga gcc atc ttt tct gcg aca gat tct gtc 779

Gly Asp Phe Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser Val

150 155 160

tgc aca ttg cag gtc ctc aat cag gat gag aca ccc ttt ttg tac agt 827
Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Phe Leu Tyr Ser
165 170 175

ctg gta ttc ggt gaa ggt gtt gtg aac gat gct aca tca att gtg ctt 875
Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Ile Val Leu
180 185 190

ttc aac gca cta cag aac ttt gat ctt gtc cac ata gat gcg gct gtc 923
Phe Asn Ala Leu Gln Asn Phe Asp Leu Val His Ile Asp Ala Ala Val
195 200 205

gtt ctg aaa ttc ttg ggg aac ttc ttt tat tta ttt ttg tcg agc acc 971
Val Leu Lys Phe Leu Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Leu Ser Ser Thr
210 215 220 225

ttc ctt gga gta ttt gct gga ttg ctc agt gca tac ata atc aag aag 1019
Phe Leu Gly Val Phe Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys Lys
230 235 240

cta tac att gga agg cat tct act gac cgt gag gtt gcc ctt atg atg 1067
Leu Tyr Ile Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met Met
245 250 255

ctc atg gct tac ctt tca tat atg ctg gct gag ttg cta gat ttg agc 1115

Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Leu Asp Leu Ser

260 265

270

ggc att ctc acc gta ttc ttc tgt ggt att gta atg tca cat tac act 1163

Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr

275 280

285

tgg cat aac gtc aca gag agt tca aga gtt aca aca aag cac gca ttt 1211

Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Ala Phe

290 295 300 305

gca act ctg tcc ttc att gct gag act ttt ctc ttc ctg tat gtt ggg 1259

Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Thr Phe Leu Phe Leu Tyr Val Gly

310

315

320

atg gat gca ttg gat att gaa aaa tgg gag ttt gcc agt gac aga cct 1307

Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Glu Phe Ala Ser Asp Arg Pro

325

330

335

ggc aaa tcc att ggg ata agc tca att ttg cta gga ttg gtt ctg att 1355

Gly Lys Ser Ile Gly Ile Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu Ile

340

345

350

gga aga gct gct ttt gta ttc ccg ctg tcg ttc ttg tcg aac cta aca 1403

Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Thr

355

360

365

aag aag gca ccg aat gaa aaa ata acc tgg aga cag caa gtt gta ata 1451

Lys Lys Ala Pro Asn Glu Lys Ile Thr Trp Arg Gln Gln Val Val Ile

370

375

380

385

tgg tgg gct ggg ctg atg aga gga gct gtg tcg att gct ctt gct tac 1499

Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala Tyr

390

395

400

aat aag ttt aca aga tct ggc cat act cag ctg cac ggc aat gca ata 1547

Asn Lys Phe Thr Arg Ser Gly His Thr Gln Leu His Gly Asn Ala Ile

405

410

415

atg atc acc agc acc atc act gtc gtt ctt ttt agc act atg gta ttt 1595

Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Met Val Phe

420

425

430

ggg atg atg aca aag cca ttg atc agg ctg ctg cta ccg gcc tca ggc 1643

Gly Met Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Leu Leu Leu Pro Ala Ser Gly

435

440

445

cat cct gtc acc tct gag cct tca tca cca aag tcc ctg cat tct cct 1691

His Pro Val Thr Ser Glu Pro Ser Ser Pro Lys Ser Leu His Ser Pro

450

455

460

465

ctc ctg aca agc atg caa ggt tct gac ctc gag agt aca acc aac att 1739

Leu Leu Thr Ser Met Gln Gly Ser Asp Leu Glu Ser Thr Thr Asn Ile

470

475

480

gtg agg cct tcc agc ctc cg^g atg ctc ctc acc aag cc^g acc cac act 1787

Val Arg Pro Ser Ser Leu Arg Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His Thr

485

490

495

gtc cac tac tac tgg cg^c aag ttc gac gac gc^g ctg atg cg^a cc^g atg 1835

Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asp Ala Leu Met Arg Pro Met

500

505

510

ttt ggc ggg cg^c ggg ttc gtg ccc ttc tcc cct gga tca cca acc gag 1883

Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ser Pro Gly Ser Pro Thr Glu

515

520

525

cag agc cat gga gga aga tgaacagtgc aaagaaatga gaatggaaatg 1931

Gln Ser His Gly Gly Arg

530

535

gtt^gatgagg agaatacatg taaaatgtga cagcaaaaga gagaaggcaa gtttgggtt 1991

tgt^gatgat^{ttt} ggctgctgct aatgagttgt tgatagtgc tatattctc agaacttcag 2051

atgg^tgc^ctc accaaggcct aagagccagg aggaccttct gataatggtt cggatgatt 2111

ggtt^{tt}ttct gtcaggatga accctagtga gtgacacagg gtgatgtgc ccgacaacct 2171

gtaaatttg tagattaaca gccccatttacacatgtcta ccatcttag ttggcggtg 2231

ttcttccta gttgccaccc tgcatgtaaa atgaaattct ccgc当地at agatttgt 2291

gtataataat tttgcttggt tgaaaaaaaaaaaaaaa 2330

<210> 2

<211> 535

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Gly Met Glu Val Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Leu Tyr Thr Thr

1 5 10 15

Ser Asp Tyr Ala Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu

20 25 30

Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val

35 40 45

Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val

50 55 60

Ile Leu Leu Met Thr Lys Gly Lys Ser Ser His Leu Phe Val Phe Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala
85 90 95

Gly Phe Gln Val Lys Lys Gln Phe Phe Arg Asn Phe Met Thr Ile
100 105 110

Thr Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Met Ile Ser Phe Phe Thr Ile Ser
115 120 125

Ile Ala Ala Ile Ala Ile Phe Ser Arg Met Asn Ile Gly Thr Leu Asp
130 135 140

Val Gly Asp Phe Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
145 150 155 160

Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Ile Val
180 185 190

Leu Phe Asn Ala Leu Gln Asn Phe Asp Leu Val His Ile Asp Ala Ala
195 200 205

Val Val Leu Lys Phe Leu Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Leu Ser Ser

210 215 220

Thr Phe Leu Gly Val Phe Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys

225 230 235 240

Lys Leu Tyr Ile Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met

245 250 255

Met Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Leu Asp Leu

260 265 270

Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr

275 280 285

Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Ala

290 295 300

Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Thr Phe Leu Phe Leu Tyr Val

305 310 315 320

Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Glu Phe Ala Ser Asp Arg

325 330 335

Pro Gly Lys Ser Ile Gly Ile Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu

340 345 350

Ile Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu

355 360 365

Thr Lys Lys Ala Pro Asn Glu Lys Ile Thr Trp Arg Gln Gln Val Val

370 375 380

Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala

385 390 395 400

Tyr Asn Lys Phe Thr Arg Ser Gly His Thr Gln Leu His Gly Asn Ala

405 410 415

Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Met Val

420 425 430

Phe Gly Met Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Leu Leu Leu Pro Ala Ser

435 440 445

Gly His Pro Val Thr Ser Glu Pro Ser Ser Pro Lys Ser Leu His Ser

450 455 460

Pro Leu Leu Thr Ser Met Gln Gly Ser Asp Leu Glu Ser Thr Thr Asn

465 470 475 480

Ile Val Arg Pro Ser Ser Leu Arg Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His

485

490

495

Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asp Ala Leu Met Arg Pro

500

505

510

Met Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ser Pro Gly Ser Pro Thr

515

520

525

Glu Gln Ser His Gly Gly Arg

530

535

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.C1⁷ C12N15/29, 5/14, C07K14/415, 16/16, C12P21/02,
 C12Q1/68, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

SWISSPROT/PIR/GENESEQ

BIOSIS (DIALOG) ,WPI (QUESTEL)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Biochimica et Biophysica Acta, 1446 (1-2), p.149-155, 1999 July 7, Atsunori Fukuda et al., "Molecular cloning and expression of the Na ⁺ /H ⁺ exchanger gene in Oryza sativa"	1-16
P, X	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96 (4), p.1480-1485, 1999 Feb.16 Gaxiola, R.A. et al., "The Arabidopsis thaliana proton transporters ,AtNhxl and Avp1, can function in cation detoxification in yeast"	1-16
P, X	WO, 99/47679, A2 (BLUMWALD EDUARDO), 23 September, 1999 (23.09.99), Full text; Figs. 1 to 8 & AU, 9928214, A	1-16
A	J.Biol.Chem., 273, p.6951-6959, 1998 March 20 Numata M. et al., "Identification of a mitochondrial Na ⁺ /H ⁺ exchanger"	1-16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 March, 2000 (28.03.00)Date of mailing of the international search report
11 April, 2000 (11.04.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07224

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J.Biol.Chem., 267(13), p.9331-9339, 1992 May 5 Orlowski J. et al., "Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins."	1-16
A	J.Biol.Chem., 267, p.9340-9346, 1992 May 5 Tse C.M., et al., "Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na(+)/H(+) exchanger isoform(NHE-3)"	1-16
A	Plant and Cell Physiology, 39(2), p.196-201, 1998 Feb. Fukuda Atsunori et al., "Na+/H ⁺ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots"	1-16
X	T. Sasaki, et al., "Rice cDNA from Panicle", Genbank accession, No.C91832, 20 April, 1998 (20.04.98),	16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/29, 5/14, C07K14/415, 16/16, C12P21/02,
C12Q1/68, A01H5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

SWISSPROT/PIR/GENESEQ

BIOSIS (DIALOG), WPI (QUESTEL)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Biochimica et Biophysica Acta, 1446(1-2), p. 149-155, 1999 July 7, Atsunori Fukuda et al., "Molecular cloning and expression of the Na+/H ⁺ exchanger gene in Oryza sativa"	1-16
P, X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(4), p. 1480-1485, 1999 Feb. 16 Gaxiola, R. A. et al., "The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhxl and Avpl, can function in cation detoxi- fication in yeast"	1-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 28.03.00	国際調査報告の発送日 11.04.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊生 4B 9838 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) . 関連すると認められる文献 引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/47679, A2 (BLUMWALD EDUARDO) 23. 9月. 1999 (23. 09. 99) 全文, 第1-8図 & AU, 9928214, A	1-16
A	J. Biol. Chem., 273, p. 6951-6959, 1998 March 20 Numata M. et al., "Identification of a mitochondrial Na+/H+ exchanger"	1-16
A	J. Biol. Chem., 267(13), p. 9331-9339, 1992 May 5 Orlowski J. et al., "Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins."	1-16
A	J. Biol. Chem., 267, p. 9340-9346, 1992 May 5 Tse C. M., et al., "Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na(+)/H(+) exchanger isoform (NHE-3)"	1-16
A	Plant and Cell Physiology, 39(2), p. 196-201, 1998 Feb. Fukuda Atsunori et al., "Na+/H+ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots"	1-16
X	GENBANK accession No. C91832 1998 Apr. 20 Sasaki T. et al., "Rice cDNA from panicle"	16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.